

Progetto FISR “Cambiamenti climatici e sistemi produttivi agricoli e forestali: impatto sulle riserve di carbonio e sulla diversità microbica del suolo”

SOILSINK

Linea di ricerca7: Carbon sink e cicli biogeochimici

Attività: MARKERS DELLE MICORRIZE PER IL CICLO DEL CARBONIO

Responsabile scientifico: Manuela Giovannetti, Dipartimento di Biologia delle Piante Agrarie, Università di Pisa

Introduzione

L'obiettivo generale della attività è quello di studiare il ruolo dei funghi micorrizici arbuscolari (AM) nei processi di trasferimento e di immagazzinamento del carbonio atmosferico nel suolo.

I funghi AM costituiscono l'interfaccia abiotica/biotica tra suolo e pianta ed hanno un ruolo centrale nella nutrizione della pianta, in quanto le loro ife sono capaci di estendersi per molti metri nel terreno e di assorbire e traslocare alle radici sia i macro- che i micronutrienti presenti nel suolo (Smith e Read, 1997; Giovannetti e Avio, 2002). Oltre a traslocare nutrienti minerali dal terreno alla pianta ospite, i funghi AM hanno anche un'importante funzione di redistribuzione delle risorse energetiche all'interno delle comunità vegetali: gli zuccheri sintetizzati da una pianta possono essere trasportati ed utilizzati da altre piante, anche appartenenti a specie diverse, che condividano lo stesso fungo simbionte e siano perciò collegate tra loro da una rete di ife fungine micorriziche (Francis and Read, 1984; Grime et al., 1987; Read, 1997). Ricerche recenti hanno dimostrato che il principale meccanismo che sta alla base della formazione di reti fungine che dalle radici si espandono tridimensionalmente nel terreno é rappresentato dalla capacità delle ife di formare anastomosi con ife originate da altri individui fungini compatibili, formando così reti di lunghezza indefinita (Giovannetti et al., 2001, 2004; Avio et al., 2006). La rottura di queste reti ifali e la riduzione del numero dei propaguli fungini, come conseguenza di alcune pratiche colturali dei sistemi agrari convenzionali, sono indicatori della diminuita stabilità del sistema pianta-suolo, in quanto vengono a mancare i principali mediatori del trasporto dei nutrienti dal terreno alla pianta e viceversa (Giovannetti & Gianinazzi-Pearson, 1994; Helgason et al., 1998).

I funghi AM rappresentano degli importanti fattori di carbon sink nel suolo, poiché il loro micelio può raggiungere la lunghezza di 50 m/g con una biomassa fino a 1800 kg/ha di suolo. Il micelio extraradicale dei funghi AM è un forte produttore di una proteina di parete, la glomalina, che si accumula nel suolo come “Glomalin-Related Soil Protein” (GRSP) in quantità variabile da 2 a 15 mg/g e, poiché contiene dal 30 al 40% di Carbonio, è considerata un ottimo strumento per compensare l'aumento dei livelli di CO₂ nell'atmosfera (Wright and Upadhyaya, 1996; Rillig et al., 2001; Bedini et al., 2007). La

glomalina ha una lunga persistenza nel suolo (turn-over: 6-42 anni), e, agendo come un potente collante, svolge anche un ruolo fondamentale nella stabilità degli aggregati e nell'immagazzinamento del carbonio nei suoli (*carbon-sink*) (Wright and Upadhyaya, 1998; Rillig et al., 1999).

Obiettivi del 1° anno

- 1) Messa a punto dei sistemi sperimentali per la valutazione della capacità di formare estese reti miceliari nel suolo da parte dei funghi AM isolati dai siti sperimentali prescelti (autoctoni), anche in confronto con ceppi presenti nella collezione IMA-Università di Pisa.
- 2) Individuazione dei ceppi fungini, autoctoni e non, più efficienti nella produzione di biomassa e nella formazione di reti.
- 3) Determinazione della produzione di glomalina da parte di funghi AM e valutazione dei ceppi più efficienti nella produzione e nell'accumulo di glomalina, ai fini della loro valutazione come agenti di carbon-sink.

Risultati 1° anno

- 1) Sono stati messi a punto sistemi sperimentali per la valutazione della capacità di formare reti ifali nel suolo da parte dei ceppi AM presenti nella collezione IMA dell'Università di Pisa, come riferimento per il confronto con i ceppi in fase di isolamento provenienti dal sito di Agugliano (Università di Ancona). Gli endofiti della collezione saggiati sono stati: *Glomus mosseae* AZ225C (Arizona), *Glomus mosseae* IMA1 (Kent), *Glomus intraradices* IMA5 (Liguria), *Glomus intraradices* IMA6 (Digione). La lunghezza del micelio extraradicale dei diversi ceppi è stata misurata dopo 4 settimane di coltura in un sistema "sandwich", costituito da piante di medica micorrizzate, il cui apparato radicale era cresciuto tra due membrane di esteri di cellulosa (Millipore). La misura totale delle ife variava da 12 a 42 m per pianta. In relazione alla lunghezza radicale, il micelio si estendeva per una lunghezza da 3 a 22 mm/mm di radice.

Per quanto riguarda i ceppi autoctoni, l'isolamento è stato effettuato come segue: ciascun campione di suolo, asciugato e omogeneizzato, miscelato in parti uguali con terragreen, è stato suddiviso in 4 vasi, seminati con medica e mais, piante altamente micotrofiche in grado di stabilire simbiosi AM con gli endofiti presenti nel suolo (Fig. 1). Le piante trappola così ottenute sono state cresciute in serra per un periodo di 4-6 mesi, al termine del quale sono state raccolte le spore dei diversi funghi AM prodotte nella rizosfera (Fig. 2). Le spore sono state distinte per morfotipo, separate ed inoculate in piantine cresciute in vasetti per 45 giorni in camera di crescita (Fig. 3). Tali piantine sono state trasferite nel sistema sperimentale "sandwich", per misurare sia la lunghezza e densità della rete miceliare che la biomassa fungina.



Fig. 1. Piante trappola (pot-cultures) di medica e mais per i funghi AM autoctoni isolato ad Agugliano (Ancona), cresciute in serra per un periodo di 4 mesi.

Fig. 2. Spore dei diversi morfotipi di funghi AM prodotte nella rizosfera delle piante trappola.

Fig. 3. Piantine di melanzana inoculate con le spore di funghi AM appartenenti ai diversi morfotipi, cresciute in cella climatica nel sistema “sandwich”.

- 2) Messa a punto di un metodo per la determinazione della biomassa fungina attraverso la quantificazione della glucosamina estratta dal micelio, mediante reazione colorimetrica e lettura allo spettrofotometro. A questo scopo sono state effettuate analisi volte alla determinazione di fattori di conversione affidabili per la trasformazione dei valori della glucosamina in biomassa fungina in isolati di *Glomus intraradices* e *Glomus mosseae*. Il micelio fungino utilizzato per gli esperimenti è stato ottenuto dal substrato in cui piante ospiti di micorrize arbuscolari sono state coltivate per almeno 6 mesi in simbiosi con l'isolato (pot-cultures), che conteneva radici micorrizzate, micelio, spore e sporocarpi. Il materiale fungino è stato separato dal substrato utilizzando il metodo “Wet sieving and decanting” (Gerdemann e Nicolson, 1963). Il micelio, liberato da radici e detriti è stato sonicato, lavato, essiccato e pesato, e analizzato per il contenuto in glucosamina rilasciata dopo trattamento alcalino e deaminazione (Ride e Drysdale 1972). La curva di taratura per la

trasformazione dei dati di densità ottica in glucosamina è stata ottenuta usando soluzioni di glucosamina

I valori di glucosamina per mg di sostanza secca fungina così ottenuti variavano da 10 a 12 µg, che rappresentano dati ai limiti inferiori dell'intervallo delle concentrazioni di glucosamina in vari generi di funghi (Appuhn e Joergensen, 2006). Tali valori saranno usati per calcolare la biomassa del micelio extraradicale cresciuto in sistema sandwich (vd. Punto 1) e per ottenere i fattori di trasformazione da lunghezza miceliare a biomassa, da utilizzare successivamente.

3) La produzione di glomalina da parte di ceppi di funghi AM, autoctoni e non, è stata determinata (a) mediante sistemi di coltura controllata utilizzando endofiti presenti nella collezione IMA del Dipartimento di Biologia delle Piante Agrarie dell'Università di Pisa (DBPA), (b) mediante analisi dei suoli prelevati dal sito sperimentale di Agugliano (Università di Ancona).

(a) Sono state allestite colture di erba medica (*Medicago sativa* L. cv. Messe), in serra, su un substrato sterilizzato. I funghi AM utilizzati sono ceppi di diversa origine geografica di due specie di *Glomus*: *Glomus mosseae* AZ225C (Arizona), *Glomus mosseae* IMA1 (Kent), *Glomus intraradices* IMA5 (Liguria), *Glomus intraradices* IMA6 (Digione). Come controllo sono stati preparati cinque vasi di erba medica non micorrizzata. La coltura è stata condotta in serra con adeguate periodiche annaffiature e concimazioni. Il substrato di crescita è stato preparato sterilizzando una miscela 1:1 di suolo agrario seccato all'aria e setacciato con setacci di 2 mm e Terragreen (calcined attapulgite clay, Oil Dri UK Ltd.). L'inoculo micorrizico era costituito dal substrato colonizzato da colture in purezza degli isolati fungini.

Analisi della Glomalina

L'estrazione della glomalina è stata effettuata secondo la procedura descritta da Wright e Upadhyaya (1996). La glomalina facilmente estraibile (EEG) è stata estratta con citrato 20 mM, pH 7.0 a 121 °C per 30 min. La glomalina totale (TG) è stata estratta con citrato di sodio 50 mM, pH 8.0 a 121 °C con più cicli di estrazione di 90 min ciascuno. Il supernatante di ciascun ciclo di estrazione è stato raccolto in un unico pool e il contenuto in proteine è stato determinato mediante lettura spettrofotometrica con il metodo Bradford usando sieralbumina bovina come standard.

Il suolo coltivato per quattro mesi con piante di erba medica micorrizzate risulta contenere una quantità di GRSP misurata sia come EEG che come TG decisamente più alta rispetto al suolo non micorrizico (NM). Dopo la coltura in presenza dei funghi AM il contenuto di GRSP del substrato è aumentato in media del 46,8 e del 51,7%, rispettivamente, sia come EEG che come TG così che, al termine della prova, la glomalina di nuova produzione nel substrato di coltura è risultata rappresentare circa un terzo del contenuto complessivo. Nelle

condizioni e nei tempi utilizzati nella prova, con tutti i ceppi fungini analizzati si sono osservate elevate produzioni della proteina.

Le differenze di produzione, riscontrate sia tra specie diverse che tra i diversi isolati sono risultate, tuttavia, statisticamente non significative (Tab. 1). La sola produzione di proteina per i ceppi studiati, nei tempi e nelle condizioni utilizzate, non risulta essere, quindi, un adeguato criterio di selezione capace di discriminare specie o isolati diversi.

Tabella 1. Test ANOVA sugli effetti della micorrizzazione, della specie e dell'isolato di simbionte fungino sul contenuto di glomalina nel substrato.

Fattore	TG		EEG	
	F	P	F	P
Micorrizzazione	35,88	<0,0001	46,08	<0,0001
Specie	0,04	0,84	0,23	0,64
Isolato	1,48	0,26	0,37	0,78

(b) La produzione di glomalina da parte di ceppi di AM autoctoni è stata determinata mediante analisi dei suoli prelevati dal sito sperimentale di Agugliano (Università di Ancona).

Campionamento e preparazione campioni di suolo

Terreni ex-frumento: sono stati prelevati 5 campioni per parcella (S, sodo; T, aratura tradizionale; 0, concimazione azotata di 0 Kg/ha; 90, concimazione azotata di 90 Kg/ha). Ogni campione era costituito da 8 carote di suolo (primi 20 cm dalla superficie) prelevate a circa 1 m di distanza tra di loro.

Terreni ex-mais: è stato prelevato, a scopo di indagine preliminare, un campione per parcella. Ogni campione era costituito da 5 carote di suolo (primi 20 cm dalla superficie) prelevate a circa 1 m di distanza tra di loro.

I campioni di suolo, sono stati seccati all'aria, setacciati attraverso maglie di 2 mm, macinati in mortaio e conservati in tubi Falcon a -20°C fino al momento del loro utilizzo.

Estrazione della glomalina

La glomalina è stata estratta sia come glomalina totale (TG) che come frazione facilmente estraibile (EEG) secondo i seguenti protocolli di estrazione: 1)TG. 3 aliquote da 1g di ogni campione sono state sottoposte a estrazioni consecutive di 90' a 120°C con 8 ml di tampone citrato 50 mM pH 9. Il surnatante di ogni estrazione è stato raccolto dopo centrifugazione e conservato a 4°C. Le estrazioni sono state ripetute fino a che il valore in contenuto proteico del surnatante non è risultato al di sotto del limite di rivelabilità del sistema di lettura. Per la quantificazione totale, il surnatante di ogni estrazione è stato raccolto a costituire un unico pool e poi analizzato.

2) EEG. 3 aliquote da 1 g di ogni campione sono state sottoposte ad una estrazione di 30' a 120°C con 8 ml di tampone citrato 30 mM pH 9.

Il contenuto in proteine degli estratti è stato determinato mediante lettura spettrofotometrica con il metodo Bradford usando sieralbumina bovina come standard.

I campioni analizzati hanno mostrato un contenuto variabile di glomalina con valori medi di 0,17 mg/g per la EEG e 1,23 mg/g per la TG. La concentrazione minima di glomalina è stata riscontrata nelle parcelle coltivate a mais con aratura tradizionale e concimazione 0 Kg/ha mentre i suoli più ricchi di glomalina sono risultati quelli provenienti dalle parcelle coltivate a frumento non arate con concimazione 90 Kg/ha. Le due frazioni di glomalina sono risultate tra loro ben correlate (r^2 0,906; $p = 0,0003$; $n = 8$). I valori riscontrati, piuttosto bassi rispetto al contenuto medio di terreni di zone temperate, risultano tuttavia conformi a quanto trovato in altri terreni agrari in ambiente mediterraneo sottoposti a ripetuti cicli di colture intensive. L'analisi statistica dei dati (ANOVA fattoriale), considerando come fattori di variabilità coltura, lavorazione e concimazione indica che la concentrazione di glomalina (TG) nei campi sperimentali di Ancona è influenzata dal tipo di coltura e di lavorazione del suolo (Tab. 2). Differenze statisticamente significative sono state trovate tra le parcelle lavorate e non lavorate (sodo e aratura tradizionale) e tra le parcelle dopo le diverse colture (frumento e mais), mentre il diverso livello di concimazione delle parcelle non è risultato essere un fattore causante differenze significative nel contenuto in glomalina.

Tabella 2. Test ANOVA sugli effetti di: coltura, lavorazione e concimazione sul contenuto di glomalina (TG) del suolo.

Fattore	TG	
	<i>F</i>	<i>P</i>
Coltura	36,93	< 0,001
Lavorazione	43,76	< 0,001
Concimazione	4,83	0,059
Coltura*Lavorazione	4,42	0,069
Coltura*Concimazione	0,05	0,826
Lavorazione*Concimazione	0,13	0,729
Coltura*Lavorazione*Concimazione	0,20	0,665

Bibliografia

Appuhn A., Joergensen R. G. (2006). Microbial colonisation of roots as a function of plant species. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 1040-1051.

- Avio L., Pellegrino E., Bonari E., Giovannetti M. (2006). Functional diversity of arbuscular mycorrhizal fungal isolates in relation to extraradical mycelial networks. *New Phytologist*, 172, 347-357.
- Bedini S., Avio L., Argese E., Giovannetti M. (2007). Effects of long-term land use on arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin-related soil protein. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 120, 463-466.
- Francis R., Read D. J. (1984). Direct transfer of carbon between plants connected by vesicular-arbuscular mycorrhizal mycelium. *Nature*, 307, 53-56.
- Gerdemann, J.W., Nicolson, T.H. (1963). Spores of endomycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Myc. Soc.* 46, 235-244.
- Giovannetti M., Avio L. (2002). Biotechnology of arbuscular mycorrhizas. In "Applied Mycology and Biotechnology". Vol. 2. Agriculture and Food Production, Elsevier, pp. 275-310.
- Giovannetti M., Fortuna P., Citernesi A. S., Morini S., Nuti M. P. (2001). The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist*, 151, 717-724.
- Giovannetti M., Sbrana C., Avio L., Strani P. (2004). Patterns of belowground plant interconnections established by means of arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist*, 164, 175-181.
- Giovannetti M., Gianinazzi-Pearson V. (1994). Biodiversity in arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research*, 98: 705-715.
- Grime J. P., Mackey J. M. L., Hillier S. H., Read D. J. Floristic diversity in a model system using experimental microcosms. 1987, *Nature*, 328, 420-422.
- Helgason T., Daniell T. J., Husband R., Fitter A. H., Young J. P. W. (1998). Ploughing up the wood-wide web? *Nature*, 394, 431.
- Read D. J. (1997). The ties that bind. *Nature*, 388, 517-518.
- Ride J. P., Drysdale R. B. (1972). A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. *Physiol. Plant Pathol.* 2, 7-15.
- Rillig M.C., Wright S.F., Allen M. F., Field C. B. (1999). Rise in carbon dioxide changes soil structure. *Nature*, 400, 628.
- Rillig M.C., Wright S.F., Kimball B.A., Pinter P.J., Wall G.W., Ottmans M.J. and Leavitt S.W. (2001). Elevated carbon dioxide and irrigation effects on water stable aggregates in a Sorghum field: a possible role for arbuscular mycorrhizal fungi. *Global Change Biology* 7, 333-337.
- Smith S. E., Read D. J. *Mycorrhizal symbiosis*. (1996). Academic Press, San Diego, USA.
- Wright S. F., Upadhyaya A. (1996). Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science*, 161, 575-586.
- Wright S. F., Upadhyaya A. (1998). A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, 198, 97-107.